

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/868924

JC18 Rec'd PCT/PTO 13 JUL 2001

P21252.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :S. HASHIMOTO et al.

Appl No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

I.A. Filed :January 20, 2000

PCT/JP00/00245

For :PROCESS FOR PRODUCING HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No.11/12392, filed January 20, 1999. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
S. HASHIMOTO et al.

Leslie Papernan Reg No.
Bruce H. Bernstein 33,329
Reg. No. 29,027

July 13, 2001
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

413 386 177

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/JP00/00245
09/868924

4
日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

20.01.00
REC'D 10 MAR 2000
WIPO PCT

JP00/245
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 1月20日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第012392号

出願人
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

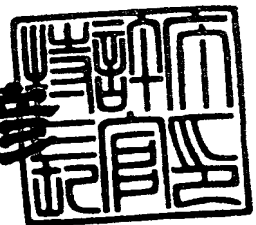
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-30095

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-1961T4

【提出日】 平成11年 1月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 7/40

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 橋本 信一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 米谷 良之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 尾崎 明夫

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

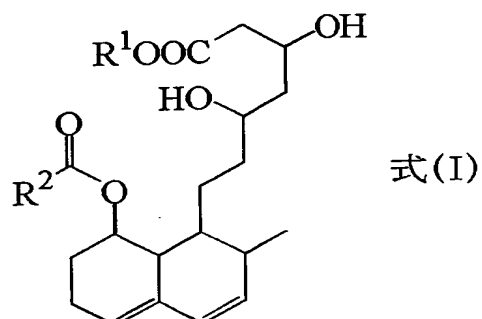
【書類名】 明細書

【発明の名称】 HMG-CoA レダクターゼ阻害剤の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 式 (I)

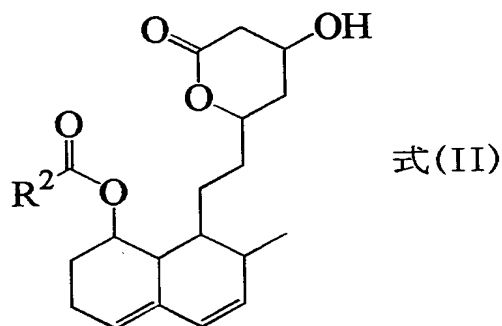
【化 1】



式(I)

(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物 (I-a) という] または式 (II)

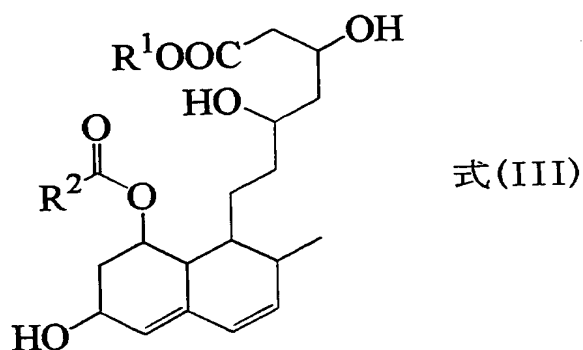
【化 2】



式(II)

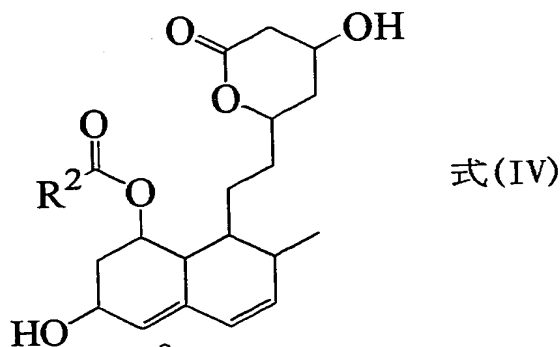
(式中、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される、化合物 (I-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (I-b) という] から、式 (III)

【化 3】



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(II-a)という]または式(IV)

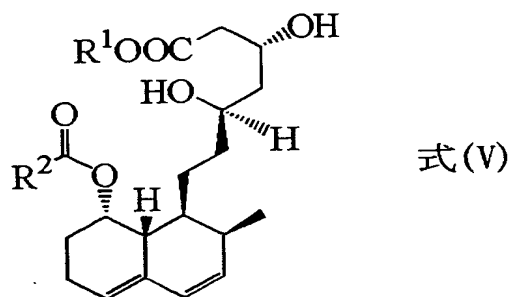
【化 4】



(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルカリまたはアリールを表す)で表される、化合物(II-a)の閉鎖ラクトン体[以下、化合物(II-b)という]を生成する活性を有し、かつ孢子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(I-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法。

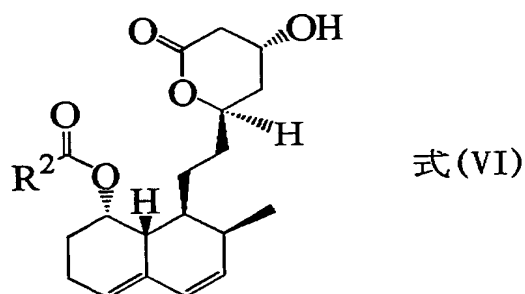
【請求項 2】 化合物(I-a)が式(V)

【化 5】



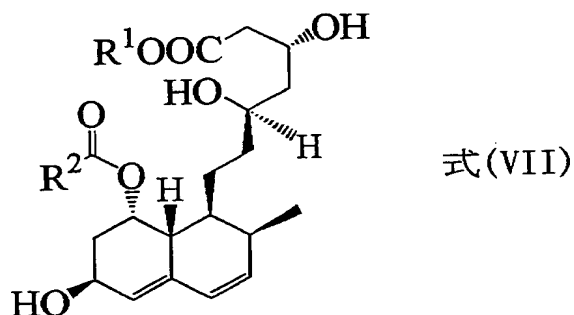
(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物[以下化合物(III-a)という]であり、化合物(I-b)が式(VI)

【化 6】



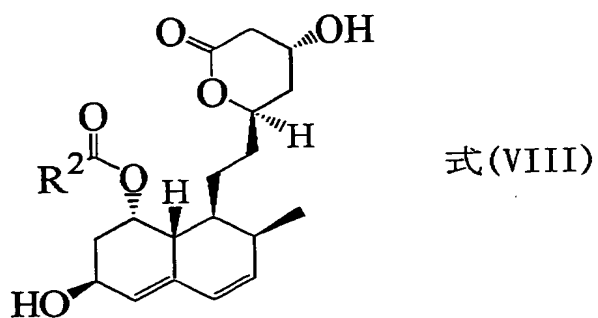
(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルカリまたはアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(III-b)という]であり、化合物(II-a)が式(VII)

【化 7】



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(IV-a)という]であり、化合物(II-b)が式(VIII)

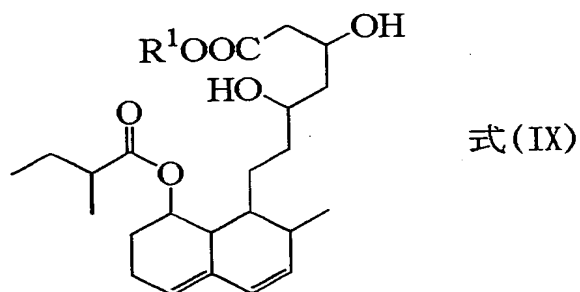
【化 8】



(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルカリまたはアリールを表す)
で表される化合物[以下、化合物(IV-b)という]である、請求項1記載の製造法。

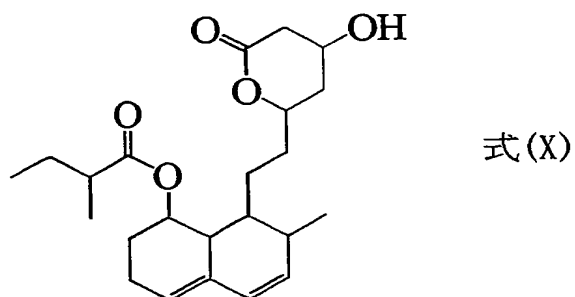
【請求項3】 化合物(I-a)が式(IX)

【化 9】



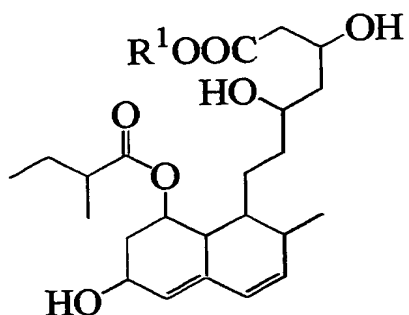
(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物[以下、化合物(V-a)という]であり、化合物(I-b)が式(X)

【化 10】



で表される化合物[以下、化合物(V-b)という]であり、化合物(II-a)が式(XI)

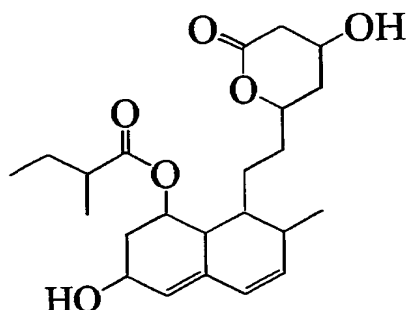
【化 1 1】



式(XI)

(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(VI-a)という〕であり、化合物(II-b)が式(XII)

【化 1 2】

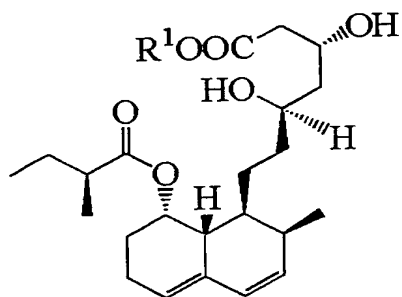


式(XII)

で表される化合物〔以下、化合物(VI-b)という〕である、請求項1記載の製造法。

【請求項4】 化合物(I-a)が式(XIII)

【化 1 3】

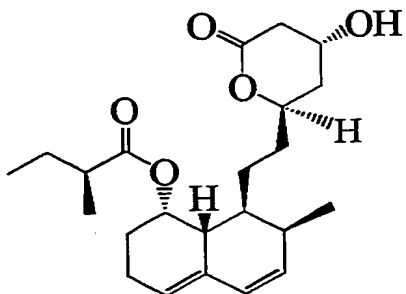


式(XIII)

(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(VII-a)という〕であり、化合物(I-b)

) が式 (XIV)

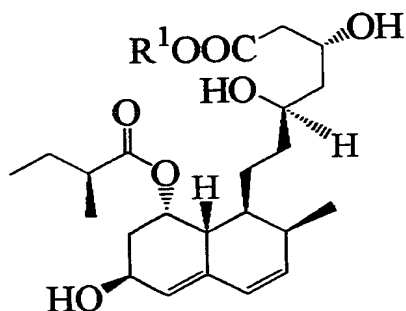
【化 14】



式 (XIV)

で表される化合物 [以下、化合物 (VII-b) という] であり、化合物 (II-a) が式 (XV)

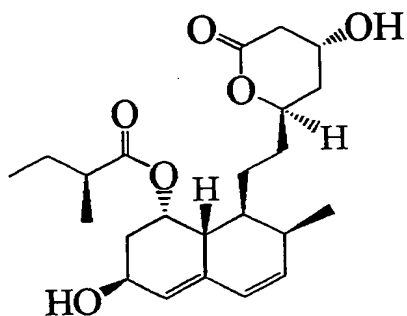
【化 15】



式 (XV)

(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VIII-a) という] であり、化合物 (II-b) が式 (XVI)

【化 16】



式 (XVI)

で表される化合物 [以下、化合物 (VIII-b) という] である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 5】化合物(II-b)が、化合物(II-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(II-b)である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 6】化合物(II-a)が、化合物(II-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(II-a)である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 7】化合物(IV-b)が、化合物(IV-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(IV-b)である、請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 8】化合物(IV-a)が、化合物(IV-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(IV-a)である、請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 9】化合物(VI-b)が、化合物(VI-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(VI-b)である、請求項 1 または 3 記載の製造法。

【請求項 10】化合物(VI-a)が、化合物(VI-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(VI-a)である、請求項 1 または 3 記載の製造法。

【請求項 11】化合物(VIII-b)が、化合物(VIII-a)よりラク톤を形成させて得られた化合物(VIII-b)である、請求項 1 または 4 記載の製造法。

【請求項 12】化合物(VIII-a)が、化合物(VIII-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(VIII-a)である、請求項 1 または 4 記載の製造法。

【請求項 13】微生物の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、請求項 1 ～ 12 いずれか 1 項に記載の製造法。

【請求項 14】微生物が、Mycobacterium属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Rhodococcus属、Gordona属、Arthrobacter属、Micrococcus属、Cellulomonas属、およびSphingomonas属に属する微生物から選ばれる微生物である、請求項 1 ～ 13 いずれか 1 項に記載の製造法。

【請求項 15】微生物がMycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous、Rhodococcus rhodnii

、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Brevibacterium acetylicum、Brevibacterium linens、Brevibacterium incertum、Brevibacterium iodinum、Micrococcus luteus、Micrococcus roseus、Cellulomonas cellulans、Cellulomonas cartae、Sphingomonas paucimobilis、Sphingomonas adhaesiva、およびSphingomonas terraeから選ばれる微生物である、請求項1～14いずれか1項に記載の製造法。

【請求項16】 微生物がMycobacterium phlei JCM5865、Mycobacterium smegmatis JCM5866、Mycobacterium thermoresistibile JCM6362、Mycobacterium neoaurum JCM6365、Mycobacterium parafortuitum JCM6367、Mycobacterium gilvum JCM6395、Rhodococcus globerulus ATCC25714、Rhodococcus equi ATCC21387、Rhodococcus equi ATCC7005、Rhodococcus erythropolis ATCC4277、Rhodococcus rhodochrous ATCC21430、Rhodococcus rhodochrous ATCC13808、Rhodococcus rhodnii ATCC35071、Rhodococcus ruber JCM3205、Rhodococcus coprophilus ATCC29080、Rhodococcus fascians ATCC12974、Rhodococcus fascians ATCC35014、Gordona amarae ATCC27808、Gordona rubropertinctus IFM-33、Gordona rubropertinctus ATCC14352、Gordona bronchialis ATCC25592、Gordona sputi ATCC29627、Gordona aichiensis ATCC33611、Gordona terrae ATCC25594、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14020、Corynebacterium glutamicum ATCC19240、Corynebacterium mycetoides ATCC21134、Corynebacterium variabilis ATCC15753、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、Arthrobacter crystallopoietes ATCC15481、Arthrobacter duodecadis ATCC13347、Arthrobacter ramosus ATCC13727、Arthrobacter sulfureus ATCC19098、Arthrobacter aurescens ATCC13344、Arthrobacter citreus ATCC11624、Arth

robacter globiformis ATCC8010、Brevibacterium acetylicum ATCC953、Brevibacterium linens ATCC19391、Brevibacterium linens ATCC9172、Brevibacterium incertum ATCC8363、Brevibacterium iodinum IF03558、Micrococcus luteus ATCC4698、Micrococcus roseus ATCC186、Cellulomonas cellulans ATCC15921、Cellulomonas cartae ATCC21681、Sphingomonas paucimobilis ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva JCM7370、および Sphingomonas terrae ATCC15098 から選ばれる微生物である、請求項 1 ～ 15 いずれか 1 項に記載の製造法。

【請求項 17】 微生物が Gordona sp. ATCC19067 である、請求項 1 ～ 15 いずれか 1 項に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

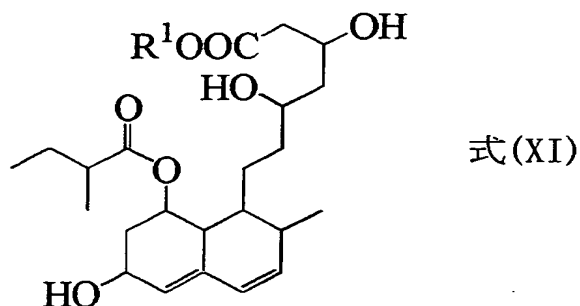
本願発明はヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMG-CoA) レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用を有する化合物の製造法に関する。

【従来の技術】

式 (XI)

【0002】

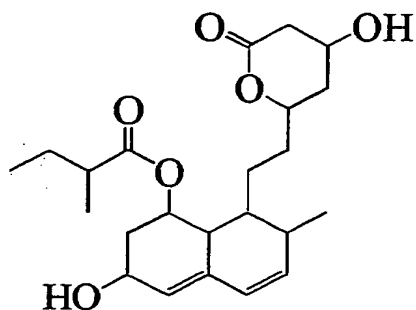
【化 17】



(式中、 R^1 は水素原子またはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VI-a) という] または式 (XII)

【0003】

【化 18】



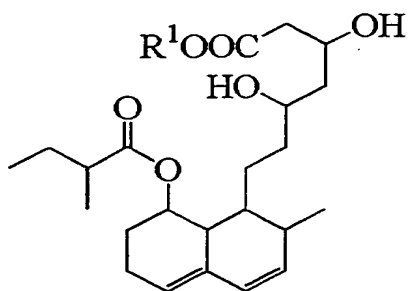
式(XII)

で表される、化合物 (VI-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (VI-b) という] は、HMG-CoA レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を示すことが知られている [ザ・ジャーナル・オブ・アンチビオチクス (The Journal of Antibiotics) 29, 1346(1976)]。

【0004】

微生物によって、式 (IX)

【化 19】

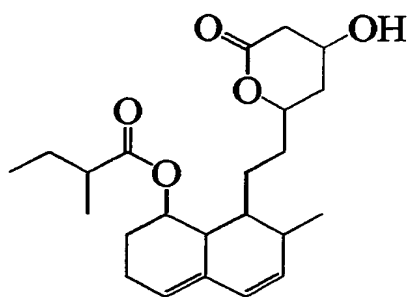


式(IX)

(式中、 R^1 は水素原子またはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (V-a) という] または式 (X)

【0005】

【化 20】



式(X)

で表される、化合物 (V-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (V-b) という] から化合物 (VI-a) または化合物 (VI-b) を生成する方法に関しては既に幾つかの報告がある。

【0006】

即ち、[特開昭 57-50894] には糸状菌を用いる方法が、[特開平 7-184670] [WO 96/40863] には放線菌を用いる方法が、また [特許第 2672551 号] には遺伝子組換え放線菌を使用した方法が述べられている。しかし、よく知られているように糸状菌や放線菌は菌糸を伸ばして成長するため、発酵槽で増殖させると培養液の粘度が上昇する。

【0007】

このため酸素が不足しやすく、培養液が不均一になるため反応効率の低下を招きやすい。この酸素不足を解消し、培養液を均一に保つためには、発酵槽の攪拌速度を上げなければならないが、攪拌速度を上げると菌糸が剪断され、微生物の活性が低下しやすい [発酵工学の基礎、p 169~190, P.F. Stansbury, A. Whitaker 著、学会出版センター (1988)]。

【0008】

さらに、上記放線菌および糸状菌はいずれも孢子を形成する能力を有する。孢子は菌体に比べはるかに飛散しやすい上、栄養細胞が容易に死滅するような条件下でも生存する能力があるため、培養、精製工程での微生物汚染源となりやすい。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本願発明の目的は、HMG-C o Aレダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を有する化合物の工業的に有利な製造法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、水酸化活性を有し、かつ孢子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物により化合物Iの水酸化を行うことができれば、孢子飛散による製造工程での微生物汚染や菌糸形成による培養液の不均一化にともなう反応効率の低下等の不都合を回避でき、工業的に有利であると考え、鋭意検討した結果、本願発明を完成するに至った。

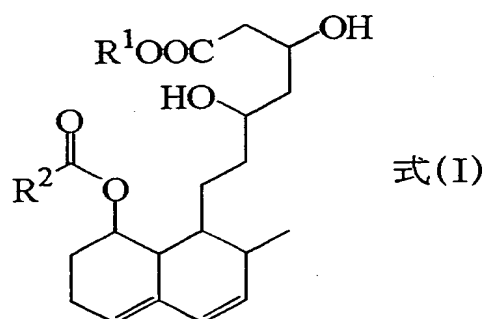
即ち、本願の発明は、以下(1)～(17)に関する。

【0011】

(1) 本願の第1の発明は、式(I)

【0012】

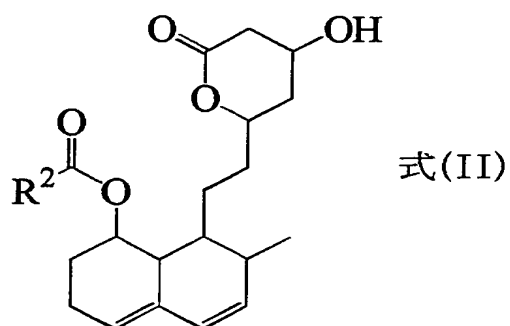
【化21】



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(I-a)という]または式(II)

【0013】

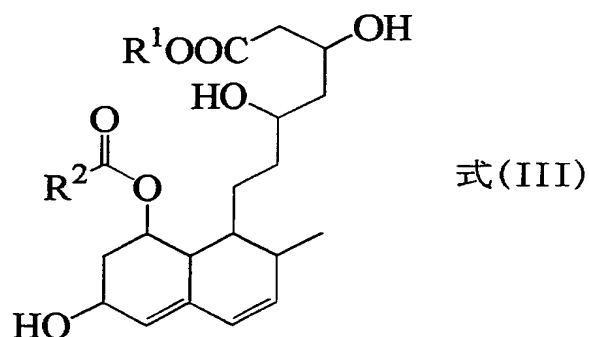
【化 2 2】



(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される、化合物 (I-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (I-b) という] から、式 (III)

【0014】

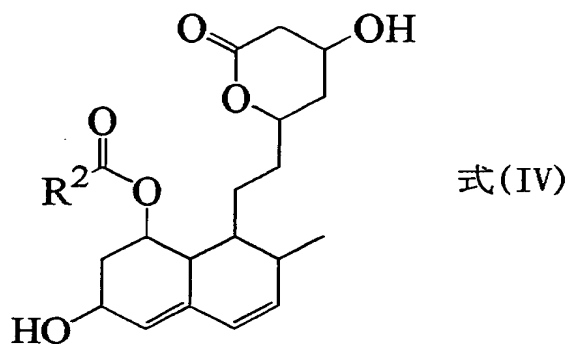
【化 2 3】



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物 [以下、化合物 (II-a) という] または式 (IV)

【0015】

【化 2 4】



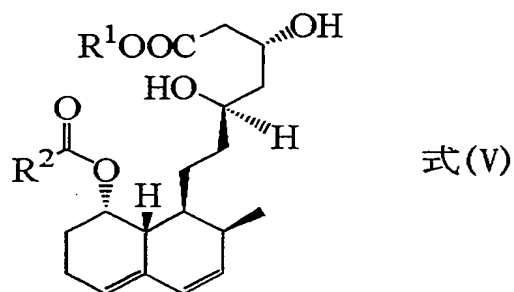
(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルカリまたはアリールを表す)で表される、化合物(II-a)の閉鎖ラクトン体[以下、化合物(II-b)という]を生成する活性を有し、かつ孢子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、化合物(I-a)または化合物(I-b)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成、蓄積させ、該水性媒体から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0016】

(2) 本願の第2の発明は、化合物(I-a)が式(V)

【0017】

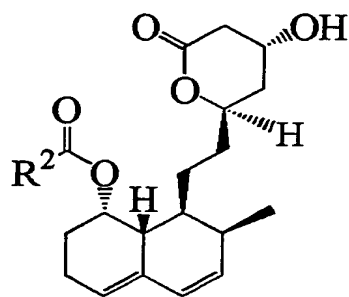
【化 2 5】



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物[以下化合物(III-a)という]であり、化合物(I-b)が式(VI)

【0018】

【化 26】

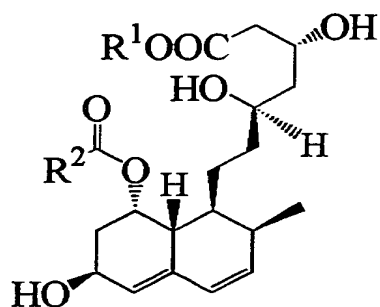


式(VI)

(式中、R²は置換もしくは非置換のアルカリまたはアリールを表す) で表される化合物[以下、化合物(III-b)という]であり、化合物(II-a)が式VII

【0019】

【化 27】

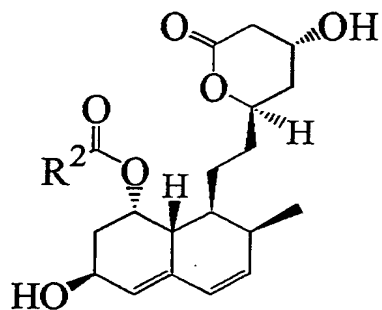


式(VII)

(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物[以下、化合物(IV-a)という]であり、化合物(II-b)が式VIII

【0020】

【化 28】



式(VIII)

(式中、R²は置換もしくは非置換のアルカリまたはアリールを表す)

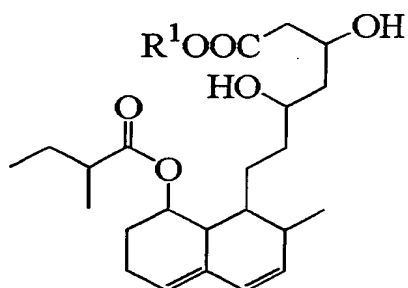
で表される化合物〔以下、化合物(IV-b)という〕である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0 0 2 1】

(3) 本願の第3の発明は、化合物(I-a)が式(IX)

【0 0 2 2】

【化 2 9】

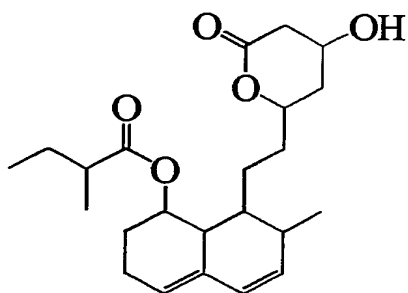


式(IX)

(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(V-a)という〕であり、化合物(I-b)が式(X)

【0 0 2 3】

【化 3 0】

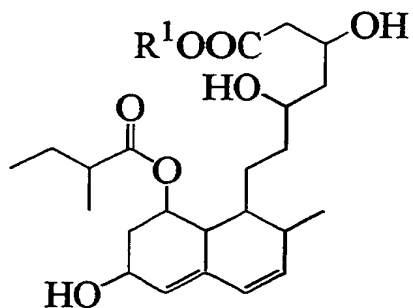


式(X)

で表される化合物〔以下、化合物(V-b)という〕であり、化合物(II-a)が式(XI)

【0 0 2 4】

【化 3 1】

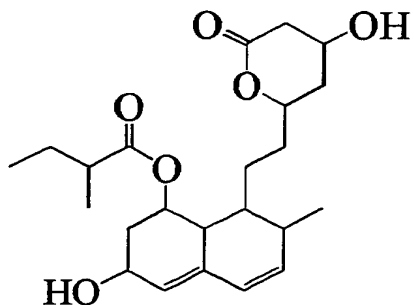


式 (XI)

(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (VI-a) という] であり、化合物 (II-b) が式 (XII)

【0 0 2 5】

【化 3 2】



式 (XII)

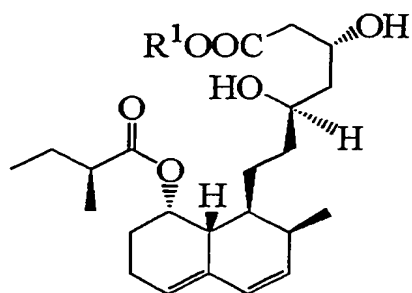
で表される化合物 [以下、化合物 (VI-b) という] である、化合物 (II-a) または化合物 (II-b) の製造法である。

【0 0 2 6】

(4) 本願の第 4 の発明は、化合物 (I-a) が式 (XIII)

【0 0 2 7】

【化 3 3】

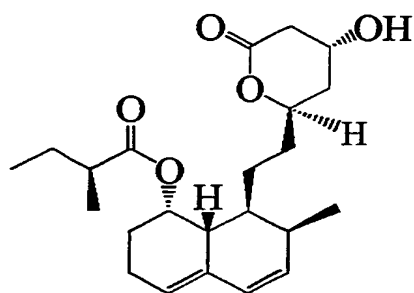


式(XIII)

(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(VII-a)という〕であり、化合物(I-b)が式(XIV)

【0028】

【化 3 4】

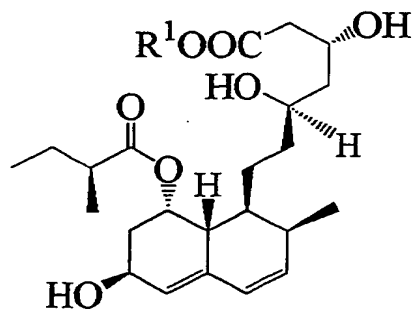


式(XIV)

で表される化合物〔以下、化合物(VII-b)という〕であり、化合物(II-a)が式(XV)

【0029】

【化 3 5】



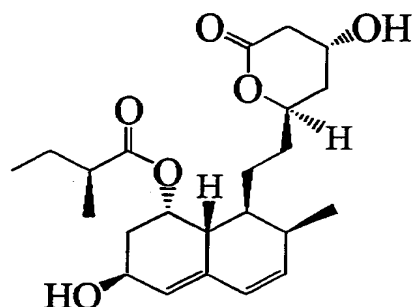
式(XV)

(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を

表す)で表される化合物[以下、化合物(VIII-a)という]であり、化合物(II-b)が式(XVI)

【0030】

【化36】



式(XVI)

で表される化合物[以下、化合物(VIII-b)という]である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

(5) 本願発明の第5の発明は、化合物(II-b)が、化合物(II-a)よりラクトンを形成させて得られた化合物(II-b)である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0031】

(6) 本願発明の第6の発明は、化合物(II-a)が、化合物(II-b)を開環させて得られた化合物(II-a)である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0032】

(7) 本願発明の第7の発明は、化合物(IV-b)が、化合物(IV-a)よりラクトンを形成させて得られた化合物(IV-b)である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0033】

(8) 本願発明の第8の発明は、化合物(IV-a)が、化合物(IV-b)のラクトンを開環させて得られた化合物(IV-a)である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0034】

(9) 本願発明の第9の発明は、化合物(VI-b)が、化合物(VI-a)を閉環ラクトン化させて得られた化合物(VI-b)である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の

製造法である。

【 0 0 3 5 】

(1 0) 本願発明の第 1 0 の発明は、化合物(VI-a)が、化合物(VI-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(VI-a)である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【 0 0 3 6 】

(1 1) 本願発明の第 1 1 の発明は、化合物(VIII-b)が、化合物(VIII-a)を閉環ラクトン化させて得られた化合物(VIII-b)である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【 0 0 3 7 】

(1 2) 本願発明の第 1 2 の発明は、化合物(VIII-a)が、化合物(VIII-b)のラク톤を開環させて得られた化合物(VIII-a)である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【 0 0 3 8 】

(1 3) 本願発明の第 1 3 の発明は、微生物の培養物の処理物が、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物から選ばれる処理物である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【 0 0 3 9 】

(1 4) 本願発明の第 1 4 の発明は、微生物が、Mycobacterium属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Rhodococcus属、Gordona属、Arthrobacter属、Micrococcus属、Cellulomonas属、およびSphingomonas属に属する微生物から選ばれる微生物である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【 0 0 4 0 】

(1 5) 本願発明の第 1 5 の発明は、微生物がMycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous

、Rhodococcus rhodnii、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Brevibacterium acetylicum、Brevibacterium linens、Brevibacterium incertum、Brevibacterium iodinum、Micrococcus luteus、Micrococcus roseus、Cellulomonas cellulans、Cellulomonas cartae、Sphingomonas paucimobilis、Sphingomonas adhaesiva、およびSphingomonas terraeから選ばれる微生物である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0041】

(16) 本願発明の第16の発明は、微生物がMycobacterium phlei JCM5865、Mycobacterium smegmatis JCM5866、Mycobacterium thermoresistibile JCM6362、Mycobacterium neoaurum JCM6365、Mycobacterium parafortuitum JCM6367、Mycobacterium gilvum

JCM6395、Rhodococcus globerulus ATCC25714、Rhodococcus equi ATCC21387、Rhodococcus equi ATCC7005、Rhodococcus erythropolis ATCC4277、Rhodococcus rhodochrous ATCC21430、Rhodococcus rhodochrous ATCC13808、Rhodococcus rhodnii ATCC35071、Rhodococcus ruber JCM3205、Rhodococcus coprophilus ATCC29080、Rhodococcus fascians ATCC12974、Rhodococcus fascians ATCC35014、Gordona amarae ATCC27808、Gordona rubropertinctus IFM-33、Gordona rubropertinctus ATCC14352、Gordona bronchialis ATCC25592、Gordona sputi ATCC29627、Gordona aichiensis ATCC33611、Gordona terrae ATCC25594、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14020、Corynebacterium glutamicum ATCC19240、Corynebacterium mycetoides ATCC21134、Corynebacterium variabilis ATCC15753、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、Arthrobacter crystallopoietes ATCC15481、Arthrobacter duodecadis ATCC

C13347、Arthrobacter ramosus ATCC13727、Arthrobacter sulfureus ATCC19098、Arthrobacter aurescens ATCC13344、Arthrobacter citreus ATCC11624、Arthrobacter globiformis ATCC8010、Brevibacterium acetylicum ATCC953、Brevibacterium linens ATCC19391、Brevibacterium linens ATCC9172、Brevibacterium incertum ATCC8363、Brevibacterium iodinum IF03558、Micrococcus luteus ATCC4698、Micrococcus roseus ATCC186、Cellulomonas cellulans ATCC15921、Cellulomonas cartae ATCC21681、Sphingomonas paucimobilis ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva JCM7370、およびSphingomonas terrae ATCC15098から選ばれる微生物である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0042】

(17) 本願発明の第17の発明は、微生物がGordona sp. ATCC19067である、化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法である。

【0043】

【発明の実施の形態】

以下、本願発明を詳細に説明する。

本願発明で用いられる酵素源としては、式(I) (式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物(I-a)という] または式(II) (式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される、化合物(I-a)の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物(I-b)という] から、式(III) (式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物(II-a)という] または一般式(IV) (式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される、化合物(II-a)の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物(II-b)という] を生成する活性を有し、かつ孢子形成能を有さず菌糸状に成育しない微生物、該微生物の培養物、該培養物の処理物があげられる。

【0044】

アルキルとしては、直鎖または分岐状の、炭素数1～10、好ましくは1～6

のアルキルであり、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、これら各種分岐鎖異性体等があげられる。

【0045】

アリールとしては、フェニル、ナフチル等があげられる。

置換アルキルにおける置換基としては、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アリール等があげられる

置換アリールにおける置換基としては、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アルコキシ等があげられる。

【0046】

アルコキシにおけるアルキル部分は上述のアルキルと同義である。

アルカリ金属とは、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、フランシウムの各元素を表す。

【0047】

上記微生物としては、例えば Mycobacterium 属、Corynebacterium 属、Brevibacterium 属、Rhodococcus 属、Gordona 属、Arthrobacter 属、Micrococcus 属、Cellulomonas 属、および Sphingomonas 属から選ばれる微生物があげられる。

【0048】

具体的には、Mycobacterium phlei、Mycobacterium smegmatis、Mycobacterium thermoresistibile、Mycobacterium neoaurum、Mycobacterium parafortuitum、Mycobacterium gilvum、Rhodococcus globerulus、Rhodococcus equi、Rhodococcus erythropolis、Rhodococcus rhodochrous、Rhodococcus rhodnii、Rhodococcus ruber、Rhodococcus coprophilus、Rhodococcus fascians、Gordona amarae、Gordona rubropertinctus、Gordona bronchialis、Gordona sputi、Gordona aichiensis、Gordona terrae、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramo

sus, Arthrobacter sulfureus, Arthrobacter aurescens, Arthrobacter citreus, Arthrobacter globiformis, Brevibacterium acetylicum, Brevibacterium linens, Brevibacterium incertum, Brevibacterium iodinum, Micrococcus luteus, Micrococcus roseus, Cellulomonas cellulans, Cellulomonas cartae, Sphingomonas paucimobilis, Sphingomonas adhaesiva, および Sphingomonas terrae から選ばれる微生物があげられる。

【 0 0 4 9 】

さらに具体的には、Mycobacterium phlei JCM5865, Mycobacterium smegmatis JCM5866, Mycobacterium thermoresistibile JCM6362, Mycobacterium neoaurum JCM6365, Mycobacterium parafortuitum JCM6367, Mycobacterium gilvum JCM6395, Rhodococcus globerulus ATCC25714, Rhodococcus equi ATCC21387, Rhodococcus equi ATCC7005, Rhodococcus erythropolis ATCC4277, Rhodococcus rhodochrous ATCC21430, Rhodococcus rhodochrous ATCC13808, Rhodococcus rhodnii ATCC35071, Rhodococcus ruber JCM3205, Rhodococcus coprophilus ATCC29080, Rhodococcus fascians ATCC12974, Rhodococcus fascians ATCC35014, Gordona amarae ATCC27808, Gordona rubropertinctus IFM-33, Gordona rubropertinctus ATCC14352, Gordona bronchialis ATCC25592, Gordona sputi ATCC29627, Gordona aichiensis ATCC33611, Gordona terrae ATCC25594, Gordona sp. ATCC19067, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium glutamicum ATCC14020, Corynebacterium glutamicum ATCC19240, Corynebacterium mycetoides ATCC21134, Corynebacterium variabilis ATCC15753, Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872, Arthrobacter crystallopoietes ATCC15481, Arthrobacter duodecadis ATCC13347, Arthrobacter ramosus ATCC13727, Arthrobacter sulfureus ATCC19098, Arthrobacter aurescens ATCC13344, Arthrobacter citreus ATCC11624, Arthrobacter globiformis ATCC8010, Brevibacterium acetylicum ATCC953, Brevibacterium linens ATCC19391, Brevibacterium linens ATCC9172, Brevibacterium incertum ATCC8363, Brevibacterium iodinum IF03558, Micrococcus luteus ATCC4698, Micrococcus roseus ATCC186, Cellulomonas cellulans ATCC15921, Cellulomonas cartae ATCC21681, Sphingomonas paucimobilis

is ATCC29837、Sphingomonas adhaesiva JCM7370、Sphingomonas terrae ATCC15098、および Gordona sp. ATCC19067等があげられる。

【0050】

また、これらの微生物の継代培養体、突然変異体もしくは誘導体、遺伝子組換え技術により製造した組み換え体等も用いられる。

本願発明に用いられる微生物の培養に用いられる培地は、本願発明の微生物が資化することができる炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、本願発明の微生物の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

【0051】

培地中の炭素源の具体例としては、例えば、グルコース、フラクトース、グリセロール、マルトース、スターチ、サッカロース等の炭水化物、酢酸、クエン酸等の有機酸、糖蜜等があげられる。

窒素源の具体例としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆ミール、綿実かす、魚ミール、各種発酵菌体およびその消化物等があげられる。

【0052】

無機物の具体例としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等があげられる。

また必要に応じてチアミン、ビオチン等のビタミン類、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸、アデニン、グアニン等の核酸関連物質を添加してもよい。

【0053】

本願発明に用いられる微生物の培養は、振とう培養、通気攪拌培養等の好気的条件下で行うことが好ましい。通気攪拌培養の場合は、発泡を防ぐため消泡剤を適量添加するのが好ましい。培養は通常20～50℃、好ましくは25～40℃で、6～1

20時間行う。培養中pHは5.0~10.0、好ましくは6.0~8.5に保持する。pHの調製は無機酸或いは有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0054】

このようにして得られる微生物の培養物の処理物としては、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物等があげられる。

【0055】

化合物(I-a)または化合物(I-b)から化合物(II-a)または化合物(II-b)への変換方法は、微生物を培養する培地に予め化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法を用いてもよいし、培養中に化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する方法を用いてもよい。また、酵素源を化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させる方法を用いてもよい。

【0056】

化合物(I-a)または化合物(I-b)を微生物を培養する培地中に添加する場合、化合物(I-a)または化合物(I-b)は培地1mlあたり0.1~10mg好ましくは0.2~1mgを培養の初発または途中で添加する。化合物(I-a)または化合物(I-b)を添加する際、メチルアルコール、エチルアルコール等の溶媒に溶解して添加してもよい。

【0057】

酵素源を、化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させる方法を用いる場合、用いる酵素の量は、当該酵素源の比活性等により異なる。例えば、酵素源として微生物の培養物もしくは該培養物の処理物を用いる場合は、酵素源を化合物(I-a)または化合物(I-b)の1mgあたり5~1000mg、好ましくは10~400mg添加する。反応は水性媒体中20~50℃で行うことが好ましく、特に25~40℃で行うことが好ましい。反応時間は用いる酵素源の量および比活性等により異なるが、通常0.5~150時間、好ましくは1~72時間である。

【0058】

水性媒体としては、水、リン酸緩衝液、HEPES(N-2ヒドロキシエチルピペラジン-N-エタンスルホン酸) 緩衝液、トリス[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン] 塩酸緩衝液等の緩衝液があげられる。反応を阻害しなければ該緩衝液に有機溶媒を添加してもよい。有機溶媒としては、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコール、エチルアルコール、ブタノール等があげられる。有機溶媒と水性媒体との混合液は、化合物(I-b)を用いる場合好ましく用いられる。

【0059】

化合物(I-b)および化合物(II-b)は下記に例示するラクTONの開環方法により、容易に化合物(I-a)および化合物(II-a)にそれぞれ変換することができる。また化合物(I-a)および化合物(II-a)は下記に例示するラクTONの生成方法により、容易に化合物(I-b)および化合物(II-b)にそれぞれ変換することができる。

【0060】

ラクTONの開環方法としては、化合物(I-b)または化合物(II-b)を水性媒体に溶解し、酸またはアルカリを添加する方法があげられる。水性媒体としては、例えば水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等反応を阻害しない塩類を含む水溶液があげられる。該水溶液中には、反応を阻害しない濃度のメタノール、エタノール、酢酸エチル等の有機溶媒を含んでいてもよい。酸としては酢酸、塩酸、硫酸等の酸が挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等があげられる。

【0061】

ラクTONの生成方法としては、化合物(I-a)または化合物(II-a)を非水系の溶媒に溶解し、酸または塩基触媒を添加する方法があげられる。非水系の溶媒としては実質的に水を含まない有機溶媒で化合物(I-a)または化合物(II-a)を溶解できるものならばいかなるものでも用いることができる。

【0062】

非水系の溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、酢酸エチル等があげられる。触媒としては、ラクTON化反応を触媒し、基質や反応産物にラクTON化以外の作

用を及ぼさないものならば、どのようなものでも用いることができる。該触媒としては、例えば、トリフルオロ酢酸やパラトルエンスルホン酸等があげられる。反応温度は特に制限はないが、0～100℃が好ましく、20～80℃が特に好ましい。

【0063】

反応終了後の上記溶液からの化合物(II-a)または化合物(II-b)の採取は、通常の有機合成化学で用いられる方法、例えば、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

【0064】

本願発明により得られる化合物(II-a)または化合物(II-b)の確認または定量方法は、化合物(II-a)および／またはII-bを確認または定量できる方法であれば、いずれの方法でも用いられる。例えば、 ^{13}C -NMRスペクトル、 ^1H -NMRスペクトル、マススペクトル、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の方法により行うことができる。

【0065】

本発明において、化合物(I-a)、化合物(I-b)、化合物(II-a)および化合物(II-b)の中には、光学異性体等の立体異性体が存在し得るものもあるが、本発明は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

【0066】

化合物(I-a)としては、式(V) (式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物(III-a) という] が好ましく、式(IX) (式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物(V-a) という] がより好ましく、式(XIII) (式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物(VII-a) という] が特に好ましい。

【0067】

化合物(I-b)としては、式(VI) (式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキル

またはアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(III-b)という]が好ましく、式(X)で表される化合物[以下、化合物(V-b)という]がより好ましく、式(XIV)で表される化合物[以下、化合物(VII-b)という]が特に好ましい。

【0068】

化合物(II-a)としては、式(VII)(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(IV-a)という]が好ましく、式(XI)(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物[以下、化合物(VI-a)という]がより好ましく、式(XV)(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物[以下、化合物(VIII-a)という]が特に好ましい。

【0069】

化合物(II-b)としては、式(VIII)(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物[以下、化合物(IV-b)という]が好ましく、式(XII)で表される化合物[以下、化合物(VI-b)という]がより好ましく、式(XVI)で表される化合物[以下、化合物(VIII-b)という]が特に好ましい。

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0070】

【実施例】

実施例 1

化合物(VII-b)(シグマ社製)100mgを9.5mlのメタノールに溶解した後、1N水酸化ナトリウム0.5mlを加えて室温で1時間振盪した。得られた反応液を乾固し脱イオン水5mlを加えて溶解し1N塩酸約0.1mlでpHを約6.5~7.5に調整し、さらに脱イオン水4.9mlを加えることにより最終濃度が10mg/mlの化合物(VII-a)[式(XIII)中 R^1 がナトリウムである化合物]を10ml得た。

【0071】

第1および2表に示した各種微生物をそれぞれ寒天培地[ペプトン(極東製薬工業製)1%、肉エキス(極東製薬工業製)0.7%、NaCl 0.3%、酵母エキス(日本製薬社製)0.2%、バクトアガー(ディフコ社製)2%、1N水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整]に塗布し、第1および2表に表示した各温度で3日間培養した。寒天培地上に生育した菌株各々を白金耳をLB培地[バクトトリプトン(ディフコ社製)1%、バクトイーストエキストラクト(ディフコ社製)0.5%、1N水酸化ナトリウムでpH7.2に調整]3mlを含む試験管に植菌し、第1および2表に示した各温度で24時間振盪培養した。培養後の培養液0.25mlをTB培地[バクトトリプトン(ディフコ社製)1.4%、バクトイーストエキストラクト(ディフコ社製)2.4%、 KH_2PO_4 0.231%、 K_2HPO_4 1.251%、1N水酸化ナトリウムでpH 7.4に調整]5mlを含む試験管に植菌し、第1および2表に示した各温度で24時間振盪培養した。24時間後、上記で得られた化合物(I-a)を終濃度が0.4mg/mlになるようにそれぞれの試験管に添加し、さらに48時間第1および2表に示した各温度で振盪して反応を行なった。

【0072】

反応終了後、反応液を酢酸でpH3.5に調整した。この反応液0.5mlに酢酸エチル1mlを加え、1時間振盪した。振盪後、3000rpm、5分間の遠心分離によって反応液を2相に分け、上清の酢酸エチル層を回収し、遠心エバポレーターで溶媒を除去した後、残渣をメタノール0.5mlに溶解した。このメタノール溶液の一部を用いてHPLC分析[カラム; Inertsil ODS-2($5\mu\text{m}$, 4x250mm, ジーエルサイエンス社製)、カラム温度; 60℃、移動相; アセトニトリル:水:リン酸=55:45:0.05、流速:0.9ml/分、検出波長:237nm]を行ない、化合物(VIII-a)[式(XV)中 R^1 はナトリウムである化合物]の検出、定量を行なった。結果を第1および2表に示す。

【0073】

【表 1】

第 1 表

菌株名		化合物II-a (mg/l)	培養温度 (℃)
<i>Mycobacterium phlei</i>	JCM 5865	1.6	37
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	JCM 5866	0.4	37
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	JCM 6362	9.1	37
<i>Mycobacterium neoaurum</i>	JCM 6365	3.7	37
<i>Mycobacterium parafortuitum</i>	JCM 6367	7.4	37
<i>Mycobacterium gilvum</i>	JCM 6395	9.6	37
<i>Rhodococcus globerulus</i>	ATCC25714	4.9	28
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC21387	2.5	30
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ATCC4277	1.4	30
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	ATCC21430	4.9	30
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC7005	1.4	30
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	ATCC13808	4.7	28
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	ATCC35071	0.4	28
<i>Rhodococcus ruber</i>	JCM 3205	0.6	28
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	ATCC29080	5.6	28
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC12974	1.3	28
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC35014	5.2	30
<i>Gordona amarae</i>	ATCC27808	1.2	30
<i>Gordona rubropertinctus</i>	IFM-33	2.5	30
<i>Gordona bronchialis</i>	ATCC25592	0.9	28
<i>Gordona rubropertinctus</i>	ATCC14352	0.7	28
<i>Gordona sputi</i>	ATCC29627	0.3	28
<i>Gordona aichiensis</i>	ATCC33611	0.6	28
<i>Gordona sp.</i>	ATCC19067	4.0	30
<i>Gordona terrae</i>	ATCC25594	0.3	28

【表 2】

第 2 表

菌株名		化合物II-a (mg/l)	培養温度 (°C)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC13032	1.1	30
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC14020	0.7	30
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC19240	1.0	30
<i>Corynebacterium mycetoides</i>	ATCC21134	0.3	30
<i>Corynebacterium variabilis</i>	ATCC15753	1.7	30
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ATCC6872	0.6	30
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	ATCC15481	0.5	30
<i>Arthrobacter duodecadis</i>	ATCC13347	0.7	30
<i>Arthrobacter ramosus</i>	ATCC13727	2.2	30
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	ATCC19098	1.1	30
<i>Arthrobacter aureus</i>	ATCC13344	1.3	30
<i>Arthrobacter citreus</i>	ATCC11624	1.2	30
<i>Arthrobacter globiformis</i>	ATCC8010	0.3	30
<i>Brevibacterium acetyllicum</i>	ATCC953	0.4	30
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC19391	0.5	30
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC9172	0.6	30
<i>Brevibacterium incertum</i>	ATCC8363	0.5	30
<i>Brevibacterium iodinum</i>	IFO3558	0.8	30
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC4698	0.5	30
<i>Micrococcus roseus</i>	ATCC186	0.4	30
<i>Cellulomonas cellulans</i>	ATCC15921	0.7	30
<i>Cellulomonas cartae</i>	ATCC21681	0.7	30
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	ATCC29837	3.4	30
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	JCM 7370	2.7	37
<i>Sphingomonas terrae</i>	ATCC15098	3.1	30

【0 0 7 4】

実施例 2

Mycobacterium gilvum JCM 6395株を実施例 1 と同様の寒天培地に塗布し、37℃で3日間培養し、寒天培地上に生育した菌株をLB培地 3 mlを含む試験管 4 本に植菌して、37℃で24時間振盪培養した。この培養液1.25mlを25mlのTB培地を含む300ml容三角フラスコ 8 本に各々植菌し、37℃で振盪培養した。24時間後に実施例 1 と同様に調整した化合物(VII-a) [式 (XTII) 中 R はナトリウムである化合物] を終濃度が0.4mg/mlになるように添加し、37℃で48時間振盪した

。反応終了後、培養液を3000rpm、4℃で10分間遠心し上清を分取した。この上清液のpHを酢酸で3.5に調整し、400mlの酢酸エチルを添加して30℃で1時間振盪した後静置し、上清を回収した。下層の水層に対して同じ操作を繰り返し、得られた酢酸エチル層をさきの上清と合わせた。この酢酸エチル層に飽和食塩水100mlを添加して振盪後、上清を回収した。

【0075】

次にこの上清に無水 Na_2SO_4 を5g添加して室温で15分間放置後、減圧により酢酸エチルを蒸発させ、乾固した。得られた残渣を脱イオン水5mlに溶解して水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整し、50mlのHP-20カラム(25x100mm、三菱化学社製)に通塔した。カラムは150mlの脱イオン水で洗浄したあと、アセトン含量20%、30%、40%のアセトン水溶液100mlで段階的に溶出した。分取した画分は

【0076】

実施例1と同様のHPLC分析を行い、化合物(VIII-a)を含む画分を回収した。減圧下でこの画分からアセトニトリルを除去し、1N塩酸で溶液のpHを3.0に調整した。この溶液に360mlの酢酸エチルを添加して振盪し、静置後上清を回収した。この上清に飽和食塩水90mlを添加し振盪、静置後、上清を回収した。

【0077】

次にこの上清に無水 Na_2SO_4 を4.5g添加して室温で15分間おいた後、減圧乾固した。得られた乾固物をジクロロメタンに溶解し、1%トリフルオロ酢酸を加えてラクトン化した。この反応物を分取用TLC[シリカゲル板; No.1.05744(200x200mm, 0.5mm厚)MERCK社製、展開溶媒; 酢酸エチル、発色液; 12.5%リンモリブデン酸・1%セリウム/10%硫酸溶液]を用いて分画し、化合物(VIII-b) 0.8mgが得られた。得られた化合物(VIII-b)のマスマスペクトルおよび ^1H -NMRスペクトル分析結果は以下の通りである。

【0078】

マスマスペクトル

日本電子製JMS-HX/HX110A質量分析計を用い、マトリックスにm-ニトロベンジルアルコールを使用してポジティブモードで測定した。その結果、m/z 407に擬似分子イオンピーク ($[\text{M}+\text{H}]^+$) を与え、化合物(II-b)の構造および分子量(406

) から期待される数値に一致した。

【 0 0 7 9 】

^1H -NMRスペクトル

日本電子製JNM- α 400型スペクトロメータを用い、重クロロホルム中、内部標準にTMSを使用し400MHzで測定した。その結果を以下に示す。このスペクトルデータは化合物(VIII-b)の公知のデータ[三共研究所年報、37、147(1985)]と一致した。

【 0 0 8 0 】

δ ppm(CDCl_3): 6.01(1H, d, $J=9.5\text{Hz}$), 5.89(1H, dd, $J=9.5, 5.9\text{Hz}$), 5.58(1H, m), 5.41(1H, m), 4.60(1H, ddd, $J=10.6, 7.3, 5.4, 2.8\text{Hz}$), 4.40(1H, m), 4.38(1H, m), 2.74(1H, dd, $J=13.1, 6.0, 4.8, 1.5\text{Hz}$), 2.40(1H, m), 2.36(1H, m), 2.34(1H, m), 1.95(1H, dddd, $J=14.4, 3.7, 2.9, 1.7\text{Hz}$), 1.86(1H, dddd, $J=12.5, 12.3, 7.3, 4.3\text{Hz}$), 1.69(1H, m), 1.68(1H, m), 1.64(1H, m), 1.57(1H, m), 1.5~1.4(2H, m), 1.43(1H, m), 1.30(1H, m), 1.12(3H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 0.91(3H, d, $J=7.1\text{Hz}$), 0.89(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$)

【 0 0 8 1 】

【発明の効果】

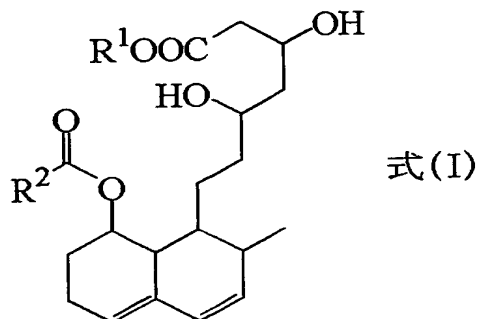
本願発明によりHMG-C o Aレダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を有する化合物を効率よく製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 HMG-CoAレダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を有する化合物の工業的に有利な製造法を提供する。

【解決手段】 式(I)



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリアルを表す)で表される化合物[以下、化合物(I-a)という]またはその閉鎖ラクトン体[以下、化合物(I-b)という]を水酸化する活性を有し、かつ孢子形成能を有さず菌糸状に生育しない微生物、該微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源として化合物(I-a)または化合物(I-b)に水性媒体中で作用させ、該水性媒体から化合物(I-a)または化合物(I-b)の水酸化物[以下、化合物(II-a)または化合物(II-b)という]を採取することを特徴とする、化合物(II-a)または化合物(I-b)の製造法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名	協和醗酵工業株式会社